12 月 December
2020, 63(12): 1473 – 1481
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020.12.005

绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象生长发育及体内解毒酶和保护酶活性的影响

樊艳平[1,4]，党海燕[2]，王宏民[3]，郑海霞[4]，成小芳[5]，张耀文[6]，张仙红[4,*]

（1. 太原师范学院地理科学学院，山西晋中 030619；2. 中华人民共和国太原海关，太原 030006；
3. 山西农业大学经济管理学院，山西太谷 030801；4. 山西农业大学植物保护学院，山西太谷 030801；
5. 山西农业大学基础部，山西太谷 030801；6. 山西省农业科学院作物科学研究所，太原 030000）

摘要：【目的】蛋白酶抑制剂是广泛存在于植物体内的一类分子量很小的蛋白质，通过影响昆虫体内酶活性，从而抑制幼虫的生长发育。本研究旨在明确绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI)对绿豆象 *Callosobruchus chinensis* 生长发育及体内酶活性的影响。【方法】采用室内人工接虫方法，测定了取食含2.0% MBTI的人工绿豆对绿豆象生长发育的抑制作用；并利用生化方法测定了绿豆象幼虫取食含不同浓度(0.5%，1.0%，1.5%和2.0%)MBTI的人工绿豆后，其体内解毒酶羧酸酯酶(CarE)和谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)及保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的变化。【结果】绿豆象幼虫取食含2.0% MBTI的人工绿豆后，幼虫体重和成虫羽化率均显著低于对照(取食感虫绿豆品种磨制的人工绿豆)，分别只有对照的72%和55%，幼期发育历期相对延长，为对照的1.083倍，而着卵量和卵孵化率并未受到显著影响；取食MBTI含量不同的人工绿豆对各龄期幼虫体内CarE，GSTs和POD活性均有一定的促进作用，而对各龄期幼虫体内SOD和CAT活性均有一定的抑制作用，抑制作用和促进作用均随MBTI含量增加而逐渐增强，且2.0% MBTI对1龄幼虫体内CarE，GSTs和POD活性的促进作用均最强，分别比对照增加了46.5%，60.5%和67.3%，2.0% MBTI分别对4龄幼虫体内SOD活性和1龄幼虫体内CAT活性的抑制作用均最强，分别为对照的80.0%和47.6%。【结论】绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象幼虫体重和成虫羽化率均有一定抑制作用，导致幼期发育历期相对延长，同时影响其体内解毒酶和保护酶活性，从而使绿豆象幼虫不能正常生长发育。

关键词：绿豆象；绿豆；胰蛋白酶抑制剂；生长发育；解毒酶；保护酶

中图分类号：Q968　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2020)12-1473-09

Effects of mung bean trypsin inhibitor on the growth and development and the activities of detoxifying and protective enzymes in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae)

FAN Yan-Ping[1,4], DANG Hai-Yan[2], WANG Hong-Min[3], ZHENG Hai-Xia[4], CHENG Xiao-Fang[5], ZHANG Yao-Wen[6], ZHANG Xian-Hong[4,*] (1. College of Geography, Taiyuan Normal University, Jinzhong, Shanxi 030619, China; 2. Taiyuan Customs, People's Republic of China, Taiyuan 030006, China; 3. College of Economics and Management, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 4. College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 5. Foundation Department, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China;

基金项目：山西省重点研发计划项目(201803D221004-8)；国家现代农业食用豆产业技术体系(CARS-08-G10)；山西省自然科学基金项目(201901D111230)

作者简介：樊艳平，女，1978 年 1 月生，山西吕梁人，博士研究生，研究方向为昆虫生态与害虫综合治理，E-mail：ndxxxy@126.com

* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：zxh6288@126.com

收稿日期 Received：2020-04-13；接受日期 Accepted：2020-07-14

6. Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030000, China)

Abstract:【Aim】Protease inhibitor is a low molecular weight protein widely found in plants that inhibits larval development by affecting enzyme activity in insects. This study aims to clarify the effects of mung bean trypsin inhibitor (MBTI) on the growth and development and enzyme activities in *Callosobruchus chinensis*.【Methods】The inhibitory effects of feeding on artificial mung bean containing 2.0% MBTI on the growth and development of *C. chinensis* were determined by means of artificial inoculation, and the activities of detoxifying enzymes, carboxylesterase (CarE) and glutathione-S-transferases (GSTs), and protective enzymes, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), in the larvae fed on artificial mung bean containing different concentrations (0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) of MBTI were measured by biochemical methods.【Results】After the larvae of *C. chinensis* fed with 2.0% MBTI, the larval weight and adult emergence rate were significantly lower than those of the control (fed with the artificial mung bean made with the susceptible mung bean variety), being 72% and 55% of that of the control, respectively, and the developmental duration of immature stages was prolonged, being 1.083-fold as long as that of the control. However, MBTI had no significant effect on the number of eggs laid on beans and egg hatching rate. The CarE, GSTs and POD activities in various instar larvae were promoted by the intake of artificial mung bean with different contents of MBTI. However, the activities of SOD and CAT in various instar larvae were inhibited by the intake of artificial mung bean with different contents of MBTI. The inhibitory and promotive effects on the enzyme activities were enhanced with the increase of MBTI content. The CarE, GSTs and POD activities in the 1st instar larvae were most strongly promoted by 2.0% MBTI, being 46.5%, 60.5% and 67.3% of that in the control, respectively. MBTI at the concentration of 2.0% showed the strongest inhibitory effect on the SOD activity in the 4th instar larvae and the CAT activity in the 1st instar larvae, being 80.0% and 47.6% of that in the control, respectively.【Conclusion】Mung bean trypsin inhibitor inhibits both the larval weight and adult emergence rate of *C. chinensis*, results in a relatively prolonged developmental duration of immature stages, and affects the activities of detoxifying enzyme and protective enzyme. Thus, the larvae of *C. chinensis* can not grow normally.

Key words: *Callosobruchus chinensis*; mung bean; trypsin inhibitor; growth and development; detoxifying enzyme; protective enzyme

绿豆象 *Callosobruchus chinensis* 属鞘翅目豆象科，在我国大部分省区均有发生，是绿豆、红豆、豇豆等豆科植物的主要害虫(Rackis and Anderson, 1964; 白旭光等, 2002; 金文林等, 2004)，仓内绿豆蛀蚀率高达43% ~69%，被蛀蚀的豆类种子营养价值受损，商品价值大幅降低(张耀文等, 2002; Mainali *et al.*, 2015)。而目前生产上对绿豆象多采用物理和化学方法进行防治(白旭光等, 2005; 张民照等, 2007; Gbaye *et al.*, 2011; 仲建锋等, 2013)，但这些方法不仅会增加成本，而且还会出现农药污染及残留毒性等问题(冷廷瑞等, 2007; 陈旭波等, 2017; 袁海滨等, 2017)，因此寻找一种既高效又安全无公害的绿豆象防治方法具有很大的现实意义。

蛋白酶抑制剂是广泛存在于植物体内的一类分子量很小的蛋白质，可抑制昆虫体内蛋白酶的活性(张兵等, 2014)，使昆虫无法正常将蛋白质消化分解获得能量来源，对幼虫的生长发育有明显抑制作用(Ryan, 1990; de Sá *et al.*, 2014)；蛋白酶抑制剂在昆虫体内还可与消化道内的蛋白酶结合形成酶抑制剂复合物阻断或减弱消化酶的蛋白水解作用，从而影响昆虫对食物的消化、吸收和利用，该复合物还能刺激昆虫消化酶的过度分泌，耗尽其体内所需的氨基酸，最终导致昆虫非正常发育或死亡(Gatehouse, 2011; Zhu-Salzman and Zeng, 2015)。昆虫体内存在着如羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)和谷胱甘肽S-转移酶(glutathione-S-transferases, GSTs)等之类的解毒酶，对有毒物质的分解和维持昆虫的正常生理代谢起重要作用(尹姣等, 2012)，还存在着如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)

等之类的保护酶，在防御外源化学物质促氧化并使昆虫免受活性氧攻击中起重要作用。研究发现，昆虫体内保护酶活性与其抗逆性均有一定的相关性（陈尚文，2001；Djordjevic，2004；Valavanidis *et al*.，2006）。

刘勇等（2000）发现，豇豆、马铃薯、水稻和玉米中的蛋白酶抑制剂可强烈影响大部分鞘翅目昆虫，尤其是仓储害虫的生长发育；谢可芳等（2002）发现，用含大豆胰蛋白酶抑制剂（soybean trypsin inhibitor，SBTI）的人工饲料饲喂棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 后，SBTI 明显抑制幼虫生长发育速度，使幼虫体重减轻；吴国昭等（2012）的研究表明，斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 取食含大豆胰蛋白酶抑制剂（SBTI）的人工饲料后，幼虫发育历期明显延长，体内 CarE 和 GSTs 活性明显升高，对其体内 SOD，POD 和 CAT 活性变化均有一定影响；徐伟等（2019）的研究表明，抗虫大豆品种中蛋白酶抑制剂活性越高，大豆食心虫幼虫发育历期明显越长，幼虫重明显越低，田间调查蛀荚率和虫食率也越低。目前，蛋白酶抑制剂的抗虫作用已被很多研究所证实，且抗虫活性的强弱与抑制剂的种类、浓度及酶与抑制剂的比例等有关（Broadway，1989），在害虫防治中已显示出一定的应用潜力（于飞等，2004；Tamhane *et al*.，2007；俞红恩和康玉凡，2017；张娴等，2018）。特别是在抗虫基因工程中，如 Hilder 等（1987）将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入烟草，获得高抗烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的转基因烟草，有效控制了烟芽夜蛾的为害。

我们的前期试验表明，取食感虫绿豆的绿豆象生长发育快，繁殖代数多，而取食抗虫绿豆的绿豆象幼虫发育不正常，甚至死亡（成小芳等，2017）；且研究发现抗虫绿豆中胰蛋白酶抑制剂活性明显高于感虫绿豆（樊艳平等，2017）。已有结果表明，蛋白酶抑制剂可以通过抑制昆虫幼虫体内蛋白酶活性从而影响鳞翅目或鞘翅目幼虫的生长发育以及存活（Gatehouse，2011；de Sá *et al*.，2014；张兵等，2014；Zhu-Salzman and Zeng，2015）。我们的前期试验也表明绿豆胰蛋白酶抑制剂（mung bean trypsin inhibitor，MBTI）对绿豆象幼虫体内蛋白酶活性如总蛋白酶、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性均有一定影响（樊艳平等，2018），那么绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象生长发育及体内其他酶如解毒酶和保护酶活性的影响如何？为此，我们采用室内人工接虫和生物测定的方法，研究了抗虫绿豆中分离纯化获得的 MBTI 对绿豆象生长发育及幼虫体内解毒酶和保护酶活性的影响作用，为明确蛋白酶抑制剂对绿豆象幼虫的杀虫机理、合成含有该抑制剂的生物农药及蛋白酶抑制剂基因的利用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试绿豆品种和试虫来源

感虫绿豆晋绿 1 号和抗虫绿豆 B18 均由山西省农业科学院作物研究所提供，供试昆虫为室内人工饲养多代的绿豆象 *C. chinensis* 幼虫，饲养条件为温度 27±1℃、相对湿度 60%～80%、光周期 12L∶12D。试验在山西农业大学昆虫学重点实验室进行。

1.2　主要试剂和仪器

乙酸萘酯、毒扁豆碱均购自 Sigma 公司；SOD，POD，CAT 和 GST 试剂盒均购自中国江苏南京建成生物研究所；考马斯亮蓝 G-250 购自北京中生瑞泰科技有限公司；标准分子量蛋白购自上海生物化学研究所；MBTI 由本实验室采用盐析法、离子交换层析和亲和层析的的方法自抗虫绿豆 B18 提取纯化而来。

多功能食品粉碎机购自广东小熊电器有限公司；天平购自北京赛多利斯仪器系统有限公司；Centrifuge 5417R 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司；HR-215S 海尔冰箱购自青岛海尔集团；Varioskan Flash 酶标仪购自美国 Thermofisher 公司。

1.3　绿豆象生长发育指标测定

用多功能食品粉碎机将感虫绿豆晋绿 1 号粉碎并通过孔径 140 μm 筛，与抗虫绿豆胰蛋白酶抑制剂混合，配制成含有 2.0% MBTI 的人工绿豆，人工绿豆的制备方法参照 Somta 等（2006）的方法。取 250 粒人工种子，随机分为 5 组分别放入自制无盖小纸杯中，再将其置于带盖大纸盒内，将室内饲养羽化 1～3 d 的绿豆象成虫 100 对雌雄配对后接于大纸盒内，任其在供试绿豆上随机产卵，将着卵绿豆置于温度 27±1℃、相对湿度 60%～80%、光周期 12L∶12D的人工培养箱中进行饲养，产卵 5 d 后，除去成虫，10 d 后统计每组总着卵量和卵孵化率，最后取 5 组的平均值。21 d 时观察是否有成虫出现，每 12 h 观察一次，同时记录羽化时间和数量，对 4 龄期幼虫进行称重，30 d 后对成虫羽化率和幼期发育历期进行测定。以感虫绿豆晋绿 1 号磨碎后制成的人工绿豆作为对照，每处理 3 次重复，每重复 40 头幼虫。所观测的生长发育指标定义如下：

着卵量（number of eggs laid on beans）（N）：绿豆表面的总着卵数量。

卵孵化率（egg hatching rate）（%）：已孵化的卵

数与总卵数的比值。

成虫羽化率(adult emergence rate)(%):成虫羽化的数量与总卵数的比值。

幼期发育历期(d)(developmental duration of immature stages):卵孵化到成虫羽化的时间。

1.4 绿豆象幼虫酶液制备

选用前述方法分别配制成含有 0, 0.5%, 1.0%, 1.5%和2.0% MBTI 5 个浓度梯度的人工绿豆,人工绿豆的制备方法参照 Somta 等(2006)的方法,绿豆象饲养方法同 1.3 节,并分别于 1, 2, 3 和 4 龄期对绿豆象幼虫体内解毒酶 CarE 和 GSTs 以及保护酶 SOD, POD 和 CAT 的活性进行测定,以感虫绿豆晋绿 1 号作为对照,每处理 3 次重复,每重复 40 头幼虫。

分别取各龄期绿豆象幼虫 10 mg 在预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液中清洗后,滤干水分,加入预冷的 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液(精确量取十二水合磷酸氢二钠 1.1098 g 和二水合磷酸二氢钠 0.2964 g 加入 50 mL 容量瓶中,用纯化水定容至 50 mL) 100 μL 冰浴上研磨,再加入上述磷酸缓冲液 900 μL 摇匀,4℃下 10 000 × g 离心 10 min,取上清液,即为测试用中肠酶液,置于冰箱保存备用,每处理 3 次重复(成小芳等, 2017)。

1.5 酶活性和蛋白质含量测定

CarE 活性测定:参照 van Asperen(1962)的方法,以 α-乙酸萘酯(4×10^{-4} mol/L)为底物,内含 10^{-4} mol/L 毒扁豆碱,取 400 μL 上述底物加入 1.0 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)和 10 μL 酶液混匀,于 37℃下水浴 30 min,加入 DBLS 显色剂使之呈现深蓝色,室温静置 15 min,用酶标仪在 600 nm 处测吸光值,以不同浓度的 α-萘酚作标准曲线。

GSTs 活性测定:GST 是通过检测还原型谷胱甘肽活性的高低反映 GSTs 活性的大小,使用可见分光光度法进行测定,具体操作步骤参照 GST 试剂盒说明书。

保护酶活性测定:SOD, POD 和 CAT 活性的具体操作方法参照中国江苏南京建成生物试剂盒说明书进行。

以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,用 Bradford(1976)方法测定,在 595 nm 处测得标准品和待测样品的吸光值,取 3 次重复的平均值,通过绘制标准曲线并查得待测样品中蛋白质含量。

1.6 数据分析

试验中生长发育指标以及解毒酶和保护酶活性测定均采取 3 次重复,以 3 次重复的平均值 ± 标准差来表示。数据记录和处理由 Softmax Pro 6.1 软件进行,数据方差分析利用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件进行数据统计和分析,处理与对照间的生长发育指标以 *t* 检验进行差异显著性检验,不同浓度 MBTI 对解毒酶和保护酶活性的影响以最小显著差异(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象生长发育的影响

由表 1 可知,绿豆象幼虫取食含 2.0% MBTI 的人工绿豆后,着卵量和卵孵化率均与对照无显著差异($P > 0.05$),而幼虫体重和成虫羽化率均显著低于对照($P < 0.05$),而幼期发育历期显著延长($P < 0.05$),说明 MBTI 对幼虫体重、成虫羽化率和幼期发育历期影响较明显。其中幼虫体重和成虫羽化率分别只有对照的 72% 和 55%,而幼期发育历期为对照的 1.083 倍。表明绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象幼虫体重、成虫羽化率和幼期发育历期均有一定影响。

表 1 人工绿豆中 2.0%绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI)对绿豆象生长发育的影响

Table 1 Effects of 2.0% mung bean trypsin inhibitor (MBTI) in the artificial mung bean on the growth and development of *Callosobruchus chinensis*

处理 Treatments	着卵量 Number of eggs laid on beans	卵孵化率(%) Egg hatching rate	幼虫体重(mg) Larval weight	成虫羽化率(%) Adult emergence rate	幼期发育历期(d) Developmental duration of immature stages
CK	224.5 ± 2.364 a	86.18 ± 0.964 a	6.90 ± 0.651 a	65.05 ± 0.339 a	23.50 ± 0.306 b
MBTI	217.5 ± 2.524 a	83.25 ± 1.047 a	4.97 ± 0.373 b	35.78 ± 0.511 b	25.45 ± 0.281 a

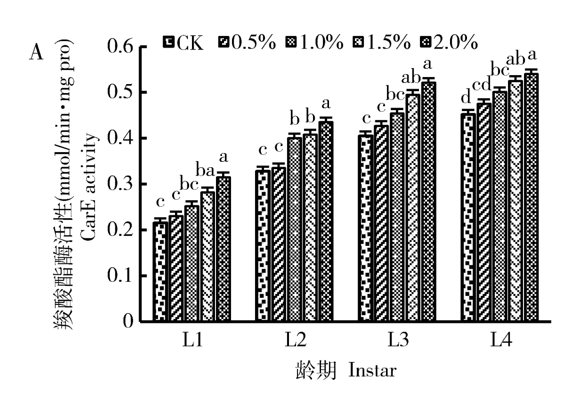
CK: 感虫绿豆 Susceptible mung bean. 表中数据为平均数 ± 标准差;同列数据后不同小写字母表示经 *t* 检验差异显著($P < 0.05$)。Data in the table are mean ± *SD*. Different small letters following the data in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$) by *t*-test.

2.2 绿豆胰蛋白酶抑制剂对不同龄期绿豆象幼虫体内解毒酶活性的影响

由图 1 可知,绿豆象幼虫取食添加不同含量 MBTI 的人工绿豆后,幼虫体内 CarE 活性随龄期的增加逐渐增加,而 GSTs 活性随龄期的增加呈现先增加后降低的趋势,并于 3 龄期达到最高。取食不

同含量 MBTI 对各龄期幼虫体内 CarE 和 GSTs 活性均有一定的促进作用,促进作用均随 MBTI 含量增加而逐渐增强,当取食 MBTI 含量为 0.5% 的绿豆后,各龄期体内 CarE 活性均与对照差异不显著($P>0.05$),说明较低的浓度对绿豆象幼虫 CarE 活性影响较小,当含量升高至 1.5% 时,各龄期幼虫体内 CarE 活性均与对照差异显著,当含量为 2.0% 时,CarE 活性在各龄期均达最高,促进效果最强,均显著高于对照($P<0.05$),CarE 活性在 1, 2, 3 和 4 龄幼虫期时分别比对照升高了 46.5%, 32.6%, 28.6% 和 19.5%;而当幼虫取食 1.0% ~ 2.0% MBTI 的人工绿豆后,各龄期幼虫体内 GSTs 活性均与对照差异显著($P<0.05$),当含量为 2.0% 时,GSTs 活性在各龄幼虫期均达最高,促进效果最强,均显著高于对照($P<0.05$),GSTs 活性在 1, 2, 3 和 4 龄幼虫期时分别比对照升高了 60.5%, 37.2%, 33.6% 和 23.4%。表明绿豆象幼虫取食含 MBTI 的人工绿豆后,通过增加幼虫体内 CarE 和 GSTs 活性来对有害物质进行分解,从而减少有害物质对其体内造成的毒害作用。

从表 2 也可以看出,绿豆象不同龄期之间幼虫 CarE 和 GSTs 的活性均在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,不同含量 MBTI 处理之间幼虫 CarE 和 GSTs 的活性也均在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,而绿豆象龄期和 MBTI 处理的交互作用对幼虫 GSTs 活性在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,而对 CarE 活性并没有显著影响($P>0.05$)。



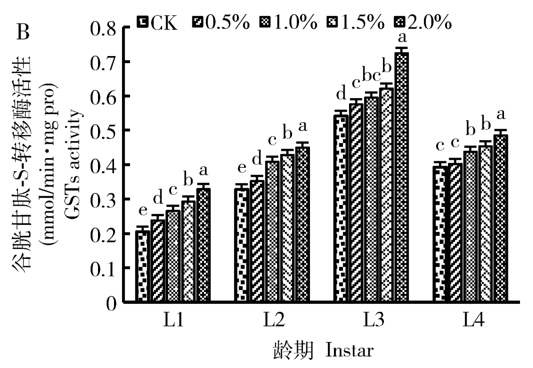


图 1　人工绿豆中不同浓度绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI)对不同龄期绿豆象幼虫体内解毒酶活性的影响

Fig. 1　Effects of mung bean trypsin inhibitor (MBTI) at different concentrations in the artificial mung bean on the activities of detoxifying enzymes in different instar larvae of *Callosobruchus chinensis*

L1 – L4: 分别为 1 – 4 龄幼虫 1st – 4th instar larva, respectively; CK: 感虫绿豆 Susceptible mung bean. 图中数据为平均数 ± 标准差;柱上不同小写字母表示经 LSD 检验同一龄期酶活性在不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。Data in the figure are mean ± *SD*. Different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$) in the enzyme activity at the same instar among different concentrations by LSD test. 图 2 同 The same for Fig. 2.

表 2　不同龄期绿豆象幼虫体内解毒酶活性的方差分析结果

Table 2　Variance analysis results of the activities of detoxifying enzymes in different instar larvae of *Callosobruchus chinensis*

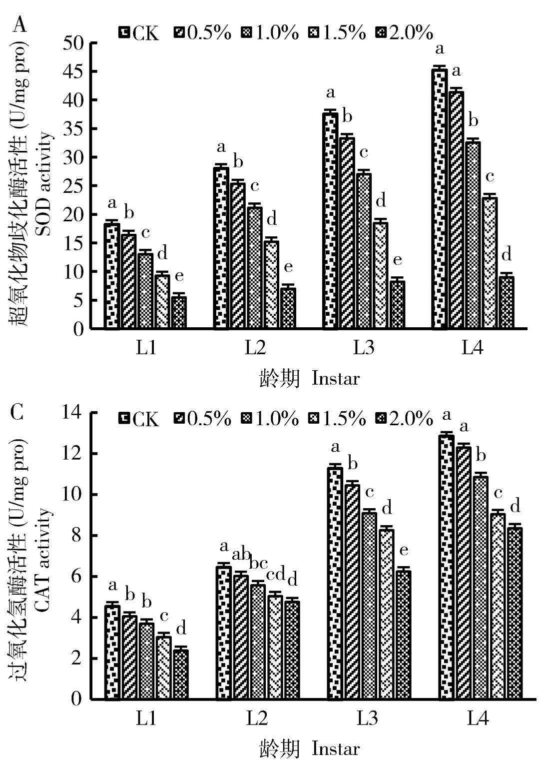
解毒酶 Detoxifying enzymes	变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	*F* 值 *F*-value
羧酸酯酶 Carboxylesterase (CarE)	龄期 Instar	3	0.5049	0.1683	368.52 **
	处理 Treatment	4	0.0858	0.0214	46.95 **
	龄期 Instar × 处理 Treatment	12	0.0032	0.0003	0.59
	误差 Error	40	0.0183	0.0005	
	总变异 Total variation	59	0.6122		
谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferases (GSTs)	龄期 Instar	3	0.9176	0.3059	2 349.99 **
	处理 Treatment	4	0.1226	0.0306	235.41 **
	龄期 Instar × 处理 Treatment	12	0.0115	0.0010	7.37 **
	误差 Error	40	0.0052	0.0001	
	总变异 Total variation	59	1.0568		

星号和双星号分别表示经 LSD 检验在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。The asterisk and double asterisk indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 level by LSD multiple range test, respectively. 表 3 同 The same for Table 3.

2.3 绿豆胰蛋白酶抑制剂对不同龄期绿豆象幼虫体内保护酶活性的影响

由图 2 可知,绿豆象幼虫取食添加不同含量 MBTI 的人工绿豆后,幼虫体内 SOD 和 CAT 活性均随龄期的增加逐渐增加,而 POD 活性随龄期的增加呈现先增加后降低的趋势,并于 3 龄幼虫期达到最高。取食 MBTI 含量不同的人工绿豆对各龄期幼虫体内 SOD 和 CAT 活性均有一定的抑制作用,抑制作用均随 MBTI 含量增加而逐渐增强,而取食不同含量 MBTI 对各龄期幼虫体内 POD 活性均有一定的促进作用,诱导作用均随 MBTI 含量增加而逐渐增强,当取食 MBTI 含量为 1.0% ~2.0% 的绿豆后,各龄期幼虫体内 SOD, POD 和 CAT 活性均与对照差异显著($P<0.05$),当取食 2.0% MBTI 时,幼虫体内 SOD 和 CAT 活性在各龄期均达最低,抑制作用最强,其中 SOD 活性在 1, 2, 3 和 4 龄幼虫期分别比对照降低了 69.8%, 75.0%, 78.0% 和 80.0%, CAT 活性在 1, 2, 3 和 4 龄幼虫期时分别比对照降低了 47.6%, 26.3%, 44.6% 和 35.0%,而当幼虫取食含 2.0% MBTI 的人工绿豆后,体内 POD 活性在各龄期均达最高,促进效果最强,POD 酶活性在 1, 2, 3 和 4 龄幼虫期分别比对照升高了 67.3%, 58.4%, 36.6% 和 35.0%。

从表 3 也可以看出,绿豆象不同龄期之间幼虫 SOD, POD 和 CAT 的活性均在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,不同含量 MBTI 处理之间幼虫 SOD, POD 和 CAT 的活性也均在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,而绿豆象龄期和 MBTI 处理的交互作用对幼虫 SOD 活性在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,对 CAT 活性在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著,而对 POD 活性没有显著影响。



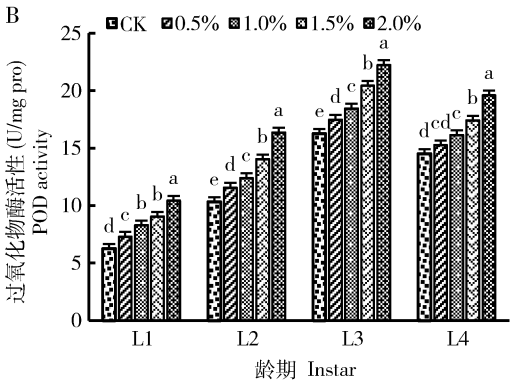


图 2 人工绿豆中不同浓度绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI)对不同龄期绿豆象幼虫体内保护酶活性的影响

Fig. 2 Effects of mung bean trypsin inhibitor (MBTI) at different concentrations in the artificial mung bean on the activities of protective enzymes in different instar larvae of *Callosobruchus chinensis*

3 结论与讨论

研究表明,寄主植物对昆虫的生长发育、繁殖和种群增长有重要影响(王世贵等, 2008; Deng *et al.*, 2013),因此如果寄主植物成分适宜,幼虫取食后生长发育速度快,存活率高;反之,发育速度慢,存活率低(苏超等, 2013)。本研究结果表明,绿豆象幼虫取食含 2.0% MBTI 的人工绿豆后,幼虫体重和成虫羽化率分别只有对照的 72% 和 55%,幼期发育历期为对照的 1.083 倍,而着卵量和卵孵化率并无显著变化(表 1),说明抗虫绿豆中含有不适宜绿豆象取食的物质,因而导致其幼虫生长发育受阻和羽化率下降,最终导致幼期发育历期也明显延长。

表 3　不同龄期绿豆象幼虫体内保护酶活性的方差分析结果

Table 3　Variance analysis results of the activities of protective enzymes of different instar larvae of *Callosobruchus chinensis*

保护酶 Protective enzymes	变异来源 Source of variation	自由度 Freedom degree	平方和 Sum of square	均方 Mean squase	F 值 *F*-value
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (SOD)	龄期 Instar	3	2 591.5716	863.8572	134.02 **
	处理 Treatment	4	4 799.0071	1 199.7518	186.14 **
	龄期 Instar × 处理 Treatment	12	608.8536	50.7378	7.87 **
	误差 Error	40	257.8198	6.4455	
	总变异 Total variation	59	8 257.2521		
过氧化物酶 Peroxidase (POD)	龄期 Instar	3	981.6155	327.2052	105.75 **
	处理 Treatment	4	206.8394	51.7098	16.71 **
	龄期 Instar × 处理 Treatment	12	5.8205	0.4850	0.16
	误差 Error	40	123.7702	3.0943	
	总变异 Total variation	59	1 318.0456		
过氧化氢酶 Catalase (CAT)	龄期 Instar	3	473.5940	157.8647	233.09 **
	处理 Treatment	4	88.3063	22.0766	32.60 **
	龄期 Instar × 处理 Treatment	12	18.5636	1.5470	2.28 *
	误差 Error	40	27.0904	0.6773	
	总变异 Total variation	59	607.5543		

CarE 和 GSTs 是昆虫体内分解有毒物质、维持正常生理代谢的重要酶系，在昆虫抵御不良环境胁迫中起着重要作用。当昆虫摄入有毒物质时，体内解毒酶活性会被迅速激活来对有毒物质进行代谢分解最终使昆虫存活下来。当绿豆象幼虫取食含 MBTI 的人工绿豆后，各龄期幼虫体内 CarE 和 GSTs 活性均有增加，且均随 MBTI 含量增加而逐渐增强，当取食 MBTI 含量较高（2.0%）的人工绿豆后各龄期幼虫体内 CarE 和 GSTs 活性均达最高，且均显著高于对照（图 1），表明 MBTI 对各龄期幼虫体内 CarE 和 GSTs 活性均有一定的促进效果，也表明绿豆象幼虫取食不适宜的物质后，需通过提高体内 CarE 和 GSTs 活性来分解有害物质对其体内造成的伤害而使绿豆象存活。此结果与斜纹夜蛾幼虫取食含大豆胰蛋白酶抑制剂的人工饲料后，生长延缓、体重减轻，且其中肠体内 CarE 和 GSTs 活性均有显著升高（吴国昭等，2012，2013）以及褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 取食抗虫水稻后体内 CarE 活性显著高于取食感虫水稻（吕仲贤等，1997）的研究结果相一致；也与棉铃虫取食含大豆胰蛋白酶抑制剂的人工饲料后，生长发育速度减慢，体重减轻（谢可方等，2002）的研究结果相一致。

昆虫体内 SOD，POD 和 CAT 能够清除细胞内由于自由基累积产生的毒害，在昆虫体内的活性变化与外界刺激物的强度有关系（尹姣等，2012）。正常情况下，这 3 种酶可以维持昆虫体内自由基的代谢平衡，但当遭遇病原物入侵或外源物质毒害后，体内自由基代谢就会发生异常，从而诱发脂质过氧化反应，并可能导致组织细胞发生氧应激性损伤（Ferrari *et al.*，2011；刘建业等，2014）。因此当昆虫取食含有抗虫成分的食物后，活性氧平衡就会受到破坏，同时活性氧累积，自由基浓度升高，最终导致昆虫生长发育受到影响（陈建明等，2002；李会平等，2006）。取食含 MBTI 的人工绿豆对绿豆象各龄期幼虫体内 SOD 和 CAT 活性均有一定的抑制作用，抑制作用均随 MBTI 含量提高而逐渐增强，而对各龄期幼虫体内 POD 活性均有一定的促进作用，且促进作用也均随 MBTI 含量增加而逐渐增强，其中取食含量为 2.0% MBTI 的人工绿豆后，对各龄期幼虫体内 SOD 和 CAT 活性的抑制作用最强，以及对体内 POD 活性的促进效果最强（图 2）。当绿豆象幼虫取食含有抗虫成分的食物后，体内 POD 活性显著升高，表明活性氧平衡受到破坏，幼虫体内氧自由基增多，因此虫体通过增加体内 POD 活性用以清除氧自由基的毒害。这与吴国昭等（2012）报道的斜纹夜蛾取食大豆胰蛋白酶抑制剂的人工饲料后，其体内的 SOD，POD 和 CAT 活性变化相一致，也与陈建明等（2002）报道的白背飞虱 *Sogatella furcifera* 取食高抗水稻后其体内 POD 活性增强相一致，但其作用机制仍需进一步研究。

参考文献（References）

Bai XG, Guo J, Li ZG, 2005. Effects of photocatalyst PE membrane for stored grain insect control. *J. Chin. Cereals Oils Assoc.*, 20(1): 73－76. [白旭光，郭静，李志刚，2005. 光触媒聚乙烯薄膜对储粮害虫的防治效果研究. 中国粮油学报，20(1): 73－76]

Bai XG, Zhao YJ, Wang DX, 2002. The Storage Pests and Prevention. Science Press, Beijing. 276 – 279. [白旭光, 赵英杰, 王殿轩, 2002. 仓储害虫及防治. 北京: 科学出版社. 276 – 279]

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein unitizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1): 248 – 254.

Broadway RM, 1989. Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. *J. Chem. Ecol.*, 15(7): 2101 – 2113.

Chen JM, Yu XP, Lü ZX, Tao LY, Zheng XS, Xu HX, Cheng JA, 2002. Changes of protective enzymes and hydroxylamine in body of the whitebacked plant hopper (WBPH) *Sogatella furcifera* Horvath feeding on resistant rice varieties. *Entomol. J. East China*, 11(2): 41 – 45. [陈建明, 俞晓平, 吕仲贤, 陶林勇, 郑许松, 徐红星, 程家安, 2002. 白背飞虱取食抗虫品种过程中体内保护酶和自由基的变化. 华东昆虫学报, 11(2): 41 – 45]

Chen SW, 2001. Relationship between drug resistance and catalase and peroxidase in *Dendrolimus punctatus*. *Acta Entomol. Sin.*, 44(1): 9 – 14. [陈尚文, 2001. 马尾松毛虫过氧化氢酶及过氧化物酶与耐药性的关系. 昆虫学报, 44(1): 9 – 14]

Chen XB, Cai FF, Shao PP, Zhong MC, Luo ZR, 2017. Fumigation activity of ethanol extract from 40 species of plants against *Callosobruchus chinensis* Linnaeus. *J. Lishui Univ.*, 39(2): 56 – 60. [陈旭波, 蔡凡凡, 邵佩佩, 钟茂程, 骆争荣, 2017. 40 种植物乙醇提取物对绿豆象的熏蒸活性测定. 丽水学院学报, 39(2): 56 – 60]

Cheng XF, Zhang YW, Zhang XH, 2017. Effects of insect-resistant mung bean on development and activities of several enzymes of Chinese bean weevil *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). *J. Plant Prot.*, 4(3): 420 – 426. [成小芳, 张耀文, 张仙红, 2017. 抗虫绿豆对绿豆象生长发育及体内几种酶活性的影响. 植物保护学报, 4(3): 420 – 426]

de Sá LFR, Wermelinger TT, da Silva Ribeiro E, de Amaral Gravina G, Fernandes KVFS, Xavier-Filho J, Venancio TM, Rezende GL, Oliveira AEA, 2014. Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Insect Physiol.*, 60(1): 50 – 57.

Deng P, Chen LJ, Zhang ZL, Lin KJ, Ma WH, 2013. Responses of detoxifying, antioxidant and digestive enzyme activities to host shift of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *J. Integr. Agric.*, 12(2): 296 – 304.

Djordjevic VB, 2004. Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.*, 237: 57 – 89.

Fan YP, Cheng XF, Wang HM, Zhang YW, Zhang XH, 2018. Effects of protease inhibitors on the activities of midgut proteases in *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus) larvae. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 29(5): 1660 – 1666. [樊艳平, 成小芳, 王宏民, 张耀文, 张仙红, 2018. 蛋白酶抑制剂对绿豆象幼虫中肠蛋白酶活性的影响. 应用生态学报, 29(5): 1660 – 1666]

Fan YP, Zhang YW, Zhao XY, Zhang XH, 2017. Activity and physico chemical properties of trypsin inhibitor in bruchid-resistant mung bean. *Acta Agronom. Sin.*, 43(11): 1696 – 1704. [樊艳平, 张耀文, 赵雪英, 张仙红, 2017. 抗豆象绿豆胰蛋白酶抑制剂活性及理化性质. 作物学报, 43(11): 1696 – 1704]

Ferrari A, Lascano C, D'Angelo AMP, Venturino A, 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 153(1): 34 – 39.

Gatehouse JA, 2011. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr. Protein Peptide Sci.*, 12(5): 409 – 416.

Gbaye OA, Millard JC, Holloway GJ, 2011. Legume type and temperature effects on the toxicity of insecticide to the genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.*, 47(1): 8 – 12.

Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D, 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330(6144): 160 – 163.

Jin WL, Tan RJ, Wang JZ, Zhang ZY, Liu CA, Pu SJ, Zhao B, 2004. Preliminary analysis on spatial distribution patterns of *Callosobruchus chinensis* eggs in adzuki bean fields. *Plant Prot.*, 30(6): 34 – 36. [金文林, 谭瑞娟, 王进忠, 张志勇, 刘长安, 濮绍京, 赵波, 2004. 田间小豆绿豆象卵空间分布型初探. 植物保护, 30(6): 34 – 36]

Leng TR, Jin ZY, Yang FJ, Xue LJ, Yu HY, Qiao YM, 2007. Studies on techniques for controlling bruchid pest of mung bean in Jilin Province. *J. Jilin Agric. Sci.*, 32(1): 42 – 43, 50. [冷廷瑞, 金哲宇, 杨付军, 薛丽静, 于海燕, 乔亚民, 2007. 吉林省绿豆象防治技术研究. 吉林农业科学, 32(1): 42 – 43, 50]

Li HP, Huang DZ, Gao J, Fan JX, Bei B, 2006. The change of activities of protective enzymes in interaction of *Apriona germari* and different resistant populus. *Acta Seric. Sin.*, 32(4): 578 – 581. [李会平, 黄大庄, 高洁, 樊金侠, 贝蓓, 2006. 保护酶在桑天牛与不同抗性杨树之间的互作过程. 蚕业科学, 32(4): 578 – 581]

Liu JY, Qian L, Jiang XC, He SQ, Li ZY, Gui FR, 2014. Effects of elevated CO_2 concentration on the activities of detoxifying enzymes and protective enzymes in adults of *Frankliniella occidentalis* and *F. intonsa* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(7): 754 – 761. [刘建业, 钱蕾, 蒋兴川, 和淑琪, 李正跃, 桂富荣, 2014. CO_2浓度升高对西花蓟马和花蓟马成虫体内解毒酶和保护酶活性的影响. 昆虫学报, 57(7): 754 – 761]

Liu Y, Ni HX, Sun JR, 2000. Research and application of insect-resistant active substances. *Plant Prot.*, 26(5): 29 – 31. [刘勇, 倪汉祥, 孙京瑞, 2000. 抗虫活性物质的研究与应用前景. 植物保护, 26(5): 29 – 31]

Lü ZX, Yu XP, Zheng XS, Chen JM, Zhang ZT, 1997. Variation in virulence of the brown planthopper to resistant rice varieties and its relation to the changes in the activities of endogenous enzymes. *Acta Entomol. Sin.*, 40(2): 122 – 127. [吕仲贤, 俞晓平, 郑许松, 陈建明, 张志涛, 1997. 褐飞虱致害性变异过程及其体内酶的变化. 昆虫学报, 40(2): 122 – 127]

Mainali BP, Kim HJ, Park CG, Yoon YN, Lee YH, Park IH, Kang HW, Bae SD, 2015. Interactive effects of temperature and relative humidity on oviposition and development of *Callosobruchus chinensis* (L.) on azuki bean. *J. Stored Prod. Res.*, 63: 47 – 50.

Rackis JJ, Anderson RL, 1964. Isolation of four soybean trypsis inhibitors by DEAE-cellulose chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15(3): 230 – 235.

Ryan CA, 1990. Protease inhibitors in plant: genes for improving

defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425 – 449.

Somta P, Talekar NS, Srinives P, 2006. Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi. *J. Stored Prod. Res.*, 42(3): 313 – 327.

Su C, Jing J, Wang MM, Fang Y, Li K, 2013. Effects of different host plants on the development and fecundity of *Lemyra alikangensis* (Strand) (Lepidoptera: Arctiidae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50 (6): 1614 – 1621. [苏超, 景军, 王猛猛, 方燕, 李恺, 2013. 不同寄主植物对三条橙灯蛾生长发育和繁殖的影响. 应用昆虫学报, 50(6): 1614 – 1621]

Tamhane VA, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS, 2007. Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene*, 403(1 – 2): 29 – 38.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M, 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64(2): 178 – 189.

van Asperen K, 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8(4): 401 – 416.

Wang SG, Zhou Y, Feng LP, 2008. Food consumption, growth and activity of digestive enzymes of *Catantops pinguis* fed on different diets under three temperatures. *J. Plant Prot.*, 35(1): 1 – 6. [王世贵, 周莹, 冯利苹, 2008. 温度和食物种类对红褐斑腿蝗取食、生长及肠道消化酶活性的影响. 植物保护学报, 35(1): 1 – 6]

Wu GZ, Hu L, Ye M, Wang RL, Zhu KY, Zeng RS, Cai W, 2012. Effects of soybean trypsinase inhibitor and defense signaling compounds on detoxification enzymes in *Spodoptera litura* (F.) larvae. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 7(6): 1952 – 1958. [吴国昭, 胡林, 叶茂, 王瑞龙, 朱克岩, 曾任森, 蔡文, 2012. 大豆胰蛋白酶抑制剂和防御信号物质对斜纹夜蛾解毒酶的影响. 应用生态学报, 7(6): 1952 – 1958]

Wu GZ, Yi NW, Hu L, Ye M, Song YY, Zhu KY, Zeng RS, 2012. Effects of soybean trypsin inhibitor and defense signaling compounds on the protective enzymes in *Spodoptera litura* larvae. *Chin. J. Ecol.*, 31(3): 652 – 658. [吴国昭, 伊能文, 胡林, 叶茂, 宋圆圆, 朱克岩, 曾任森, 2012. 大豆胰蛋白酶抑制剂和防御信号物质对斜纹夜蛾幼虫保护酶的影响. 生物学杂志, 31(3): 652 – 658]

Wu GZ, Zhu KY, Zeng RS, 2013. Effects of soybean trypsin inhibitor on growth and development phase of *Spodoptera litura* (F.). *Ecol. Environ. Sci.*, 22(8): 1335 – 1340. [吴国昭, 朱克岩, 曾任森, 2013. 大豆胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾生长发育的影响. 生态环境学报, 22(8): 1335 – 1340]

Xie KF, Dong AW, Xin H, Zhan SX, Ding B, Gu QM, Cao KM, 2002. A study of the stability and insect resistance of soybean Kuntiz type trypsin inhibitor. *J. Fudan Univ.* (*Nat. Sci.*), 41(6): 631 – 634. [谢可方, 董爱武, 忻骅, 詹树萱, 丁波, 顾其敏, 曹凯鸣, 2002. 大豆 KUNITZ 型胰蛋白酶抑制剂的稳定性及抗虫性研究. 复旦学报(自然科学版), 41(6): 631 – 634]

Xu W, Zhang YK, Dong YN, Fan RD, Shi SS, 2019. Analysis of proteinase inhibitor activity of different soybean varieties and their effects on *Leguminivora glycinivorella* larvae. *J. Jilin Agric. Univ.*, 41(3): 267 – 273. [徐伟, 张益恺, 董亚南, 樊瑞冬, 史树森, 2019. 不同品种大豆蛋白酶抑制剂活性及其对大豆食心虫幼虫的影响. 吉林农业大学学报, 41(3): 267 – 273]

Yin J, Feng HL, Li KB, Cao YZ, 2012. Effects of host plants on the activities of some detoxification enzymes and protective enzymes in the meadow moth. *Plant Prot.*, 38(1): 35 – 39. [尹姣, 冯红林, 李克斌, 曹雅忠, 2012. 寄主植物对草地螟中肠解毒酶及保护性酶活性的影响. 植物保护, 38(1): 35 – 39]

Yu F, Zeng XN, Xiong ZH, Du LX, 2004. Study and application of proteinase inhibitors on pest control. *Plant Prot.*, 30(3): 13 – 17. [于飞, 曾鑫年, 熊忠华, 杜利香, 2004. 蛋白酶抑制剂在害虫防治中的研究与应用. 植物保护, 30(3): 13 – 17]

Yu HE, Kang YF, 2017. Research progress in legume trypsin inhibitor. *Food Ind.*, 38(4): 265 – 269. [俞红恩, 康玉凡, 2017. 豆类胰蛋白酶抑制剂研究进展. 食品工业, 38(4): 265 – 269]

Yuan HB, Li YS, Zhao XY, Ge SY, Liu JH, Ren XC, 2017. Fumigant activity and repellent effect of three kinds of essential oil against *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus) adults. *J. Jilin Agric. Univ.*, 39(1): 28 – 31. [袁海滨, 李玉双, 赵欣阳, 葛思妍, 刘景皓, 任孝慈, 2017. 3 种植物精油对绿豆象成虫的熏蒸及驱避活性. 吉林农业大学学报, 39(1): 28 – 31]

Zhang B, Zhao MY, Zhang R, 2014. The research progress of serine protease inhibitors. *J. Shenyang Pharm. Univ.*, 31(10): 836 – 842. [张兵, 赵明沂, 张嵘, 2014. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展. 沈阳药科大学, 31(10): 836 – 842]

Zhang MZ, Jin WL, Wang JZ, Sun SL, Qin XC, Zhang ZY, 2007. Insecticidal efficacy of microwave treatment against *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its effects on the germination rate of adzuki beans. *Acta Entomol. Sin.*, 50(9): 967 – 974. [张民照, 金文林, 王进忠, 孙淑玲, 覃晓春, 张志勇, 2007. 微波处理对绿豆象的杀虫效果及对红小豆发芽率的影响. 昆虫学报, 50(9): 967 – 974]

Zhang X, Liao DY, Gou XZ, Zhou JY, Liao H, 2018. Structure and function of plant Kunitz protease inhibitor. *J. Plant Physiol.*, 54 (9): 1391 – 1400. [张娴, 廖东颖, 缑绪卓, 周嘉裕, 廖海, 2018. 植物 Kunitz 型蛋白酶抑制剂的结构与功能. 植物生理学报, 54(9): 1391 – 1400]

Zhang YW, Zhao XY, Cheng XZ, 2002. Screening and identification of bruchid-resistant materials of mungbean. In: Proceedings of the Development and Utilization Technology of Mung Bean Industry. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 116 – 118. [张耀文, 赵雪英, 程须珍, 2002. 绿豆抗豆象素材的筛选及鉴定. 见: 中国绿豆产业发展与科技应用. 北京: 中国农业科学技术出版社. 116 – 118]

Zhong JF, Wan ZH, Li L, Chen HW, Wu GH, 2013. Effect of low and high temperatures on controlling azuki bean beetle (*Callosobruchus chinensis* L., Coleoptera: Bruchidae) in storage. *Sci. Agric. Sin.*, 46(1): 54 – 59. [仲建锋, 万正煌, 李莉, 陈宏伟, 伍广洪, 2013. 低温和高温对仓储绿豆象的防治效果. 中国农业科学, 46(1): 54 – 59]

Zhu-Salzman K, Zeng R, 2015. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 131 – 132.

(责任编辑: 赵利辉)